第4卷第3期 动物学研究 Vol. 4, No. 3
1983年8月 ZOOLOGICAL RESEARCH Aug., 1983

烙铁头*Trimeresurus Mucrosquamatus*蛇毒对血小板的活化作用*

阮长耿 奚晓东 万海英 李佩霞 顾振纶 潘建新 朱路佳
(苏州医学院血栓形成与止血研究室) (苏州医学院药理教研室)

王婉瑜 熊郁良 杨长久 陈锡兰
(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

烙铁头*Trimeresurus Mucrosquamatus*蛇毒(TMV)可引起人和多种动物(狗、家兔、豚鼠)血小板的活化,发生聚集。血小板聚集强度与加入TMV的量有关。豚鼠血小板对TMV最为敏感,TMV引起豚鼠、家兔、狗和人的血小板聚集的最低剂量分别为0.6、12.5、2.0、2.0μg/ml。EDTA抑制而肝素不影响TMV对血小板的聚集作用。TMV的血小板聚集反应伴有5羟色胺的释放,引起家兔血小板5羟色胺最大释放(72%)的TMV剂量为100μg/ml。TMV还可以诱导血小板血栓恶烷A_2的形成。阿斯匹林能阻断TMV诱导的血栓恶烷A_2的生成,但并不抑制TMV引起的血小板聚集反应,提示TMV可能通过不依赖于血栓恶烷A_2的途径活化。初步结果表明TMV是研究血小板生理机制的有用工具。

蛇毒对血液凝固和纤溶系统的作用已有较深入的研究(阮长耿1979)。而蛇毒对血小板的作用则较晚才有认识。自Davey和Lüscher(1965)报导蛇毒对血小板有活化作用以来已发现了许多促使血小板聚集的蛇毒成分。它们都是蝰科蝮亚科毒蛇分泌的蛇毒,但它们的作用机制不完全相同。Read等(1978)报导在美洲矛头蝮(*Bothrops jararaca*)和美丽矛头蝮(*Bothrops alternatus*)的蛇毒中存在一种辅凝聚素(*Coagglutinin*),依赖于正常血浆中存在的von Willebrand因子。而从矛头蝮(*Bothrops atrox*)提取的*Thrombocytin*(Niewiarowski et al. 1979)和从响尾蛇(*Crotalus horridus horridus*)提取的*Crotalocytin*(Schmaier 1980)都是丝氨酸蛋白酶,它们对血小板的作用与凝血酶有相似之处。Ougang等(1978)报导在台湾产的烙铁头(*Trimeresurus Mucrosquamatus*)蛇毒亦能促使血小板聚集,并认为其作用机理是通过前列腺素合成

* 参加本文部分技术工作的尚有王雅琴、陆群、张威等同志。本文1982年12月11日收到。

途径的（Ouyang and Teng 1979）。我们研究了湖南产的烙铁头蛇毒（TMV）对血小板的作用，发现其引起血小板聚集的作用并不依赖于血栓噁烷A_2（Thromboxane A_2）的生成，即不通过前列腺素合成，而由其它途径促使血小板活化的。兹将初步结果报导如下。

材 料 和 方 法

一、蛇毒和试剂

本文使用的系由湖南省采集的烙铁头蛇毒（Trimeresurus Mucrosquamatus venom 简称TMV），经真空干燥制成粉末后，贮存于冷藏干燥器中备用。花生四烯酸(AA)，Sigma产品。TritonX-100，Sigma产品。邻苯二甲醛（OPT），Fluka产品。5—羟色胺，中国医药公司瑞士进口分装。肝素，苏州制药厂产品。其余试剂均为国产，纯度符合实验要求。

二、富血小板血浆的制备

人与各种动物的血液均收集于硅化的离心管内，并以0.11M枸橼酸钠 9：1（V/V）抗凝，室温离心10分钟（800转/分），取上层液即为富血小板血浆（简称PRP）。剩余血液继续离心10分钟(3000转/分)，分离出乏血小板血浆（简称PPP）作为测定时对照或用于调节PRP中的血小板数，一般试验中PRP的血小板数调节在 30—60万mm^3。在个别实验中以EDTA、草酸钠或肝素抗凝，其最终浓度分别为 5.4mM、10mM和4.8u/ml。

三、血小板聚集试验

血小板聚集程度按比浊法（Caen et al, 1975）进行测定，采用BS631型血小板聚集仪（北京生化仪器厂）连结于XWZK型记录仪（上海自动化仪表三厂）。测定时先在对照管中加入0.45mlPPP，校正诱光度为100%，然后在测定管中加入 0.45mlPRP，校正透光度为10%，37°C预热 2 分钟后，在磁棒搅拌下（1000转／分），加入 20—25ml 的蛇毒溶液（TMV最终浓度在结果中表示），同时记录血小板聚集的波形。聚集强度按下式计算：

$$\text{聚集率}(\%)=\frac{\text{聚集后PRP透光度}-\text{聚集前PRP透光度}}{\text{PPP透光度}-\text{聚集前PRP透光度}}\times 100\%$$

四、血小板 5—羟色胺的含量及其释放反应

5—羟色胺（5-HT）含量测定按Curzon和Green（1970）的荧光光度法，略加以修改。0.4mlPRP（对照管以PPP0.4ml代替)与0.1ml 0.5% TritonX-100 混合，然后加入 3 ml 酸化正丁醇，摇匀，震荡 5 分钟，离心 5 分钟（3000转/分）。弃去有机相，取水相0.5ml，加入0.004%OPT3ml，置沸水浴15分钟，再以水冷却后用荧光光度计（岛津RF—510型）进行荧光光度测定（激发光为365nm；发射光为480nm）。测定管（PRP）结果减去对照管（PPP），并与同样操作的5-HT标准管比较，求得血小板 5—羟色胺的含量。TMV引起血小板5-HT释放反应的研究，则在PRP中加入 TMV 引起聚集后（约 3 — 6 分钟），立即离心（12000转/分）2 分钟，取上层血浆0.4ml，按上法测定其释出的5-HT含量。

五、血栓恶烷A_2（TXA_2）的测定

按 Needleman（1976）的生物测定法加以修改。取健康家兔，猛击其头部致死，打开胸腔取出胸主动脉，取近心端的一段，依螺旋形剪成条片（长2.5—3cm；宽3—4mm），置于盛有Kreb氏液的恒温（37°C）浴槽中，不断通入氧气，动脉条一端固定在通气钩上，另一端固定在DC—001型离体器官测定仪（南京仪表厂）的换能器上，平衡1.5—2小时后开始给药，并描记动脉条收缩曲线。首先以$1.48\times10^{-2}M$重酒石酸去甲肾上腺素（NA）0.15ml测试动脉条反应（浴槽内NA的最终浓度为$1.48\times10^{-4}M$，然后换用含有拮抗合剂的Kreb氏液，再测定AA与PRP孵育或TMV与PRP孵育后生成的TXA_2样物质使动脉条产生的反应。以NA引起的动脉收缩幅度两次反应的平均值为标准（100%），TMV（或AA）与PRP孵育后生成的TXA_2样物质所致动脉条收缩幅度与之相比，求其收缩百分率（%），作为PRP释放TXA_2样物质的相对量。

结　果

一、TMV的血小板聚集作用

TMV可引起人与多种动物（狗、家兔、豚鼠）血小板的聚集。血小板聚集的强度与TMV量相关，引起家兔血小板聚集率最高（51.62%）的TMV浓度为100μg/ml（表1）。

表 1　不同浓度TMV引起家兔血小板的聚集率*
Aggregation rate of rabbit platelet induced by TMV*

TMV的最终浓度 final concentration of TMV (μg/ml)	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200
血小板聚集率 Platelet aggregation rate (%)							
平均值 average value	0	6.05	23.93	37.43	46.6	51.62	49.73
标准差 standard deviation	0	13.53	15.32	7.71	8.15	6.46	6.50

由 6 只家兔测得的结果
* These data were obtained from 6 rabbits.

豚鼠血小板对TMV最为敏感，引起豚鼠血小板发生聚集的TMV最低浓度（阈值）为0.6μg/ml，但0.2μg/ml时已能引起豚鼠血小板发生变形。而引起人、家兔和狗的血小板发生聚集的TMV最低浓度分别为2.0、12.5和2.0μg/ml（图1）。

0.45ml人和各种动物（兔、狗、豚鼠）PRP在BS631型血小板聚集仪37°C预热2分钟后，加入TMV（图示最终浓度μg/ml）。

以各种不同的抗凝剂采集血液而制备的PRP对TMV的反应性亦有差别。肝素影响最小，由肝素抗凝制备的PRP对TMV的聚集反应与枸橼酸钠抗凝的结果差别不大，其次为草酸钠抗凝剂，而EDTA影响最大，其PRP对TMV没有反应（图2）。

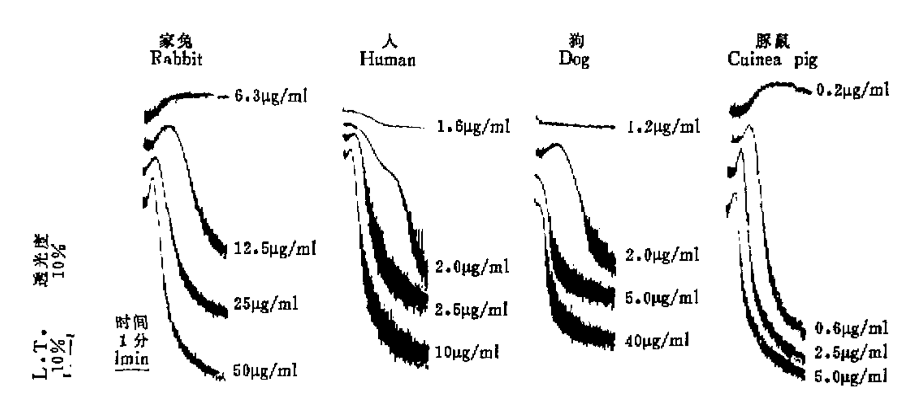


图1 不同种族血小板对TMV的反应性

Fig 1 RESPONSES OF PLATELETS FROM DIFFERENT SPECIES TO TMV (Venom of Trimeresurus Mucrosquamatus)
(TMV was added to the PRP at the final concentrations in μg/ml as indicated)

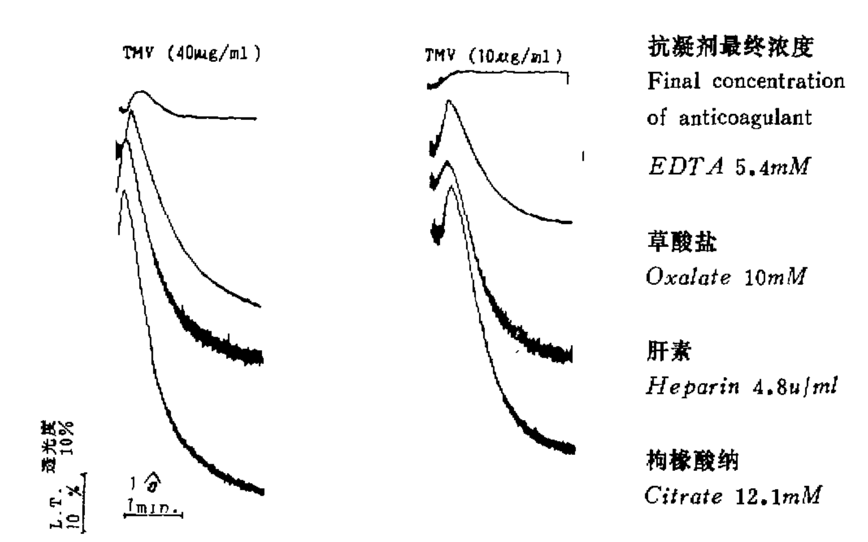


图2 各种抗凝剂对TMV血小板聚集作用的影响

Fig 2 THE EFFECTS OF THE DIFFERENT ANTICOAGULANTS ON THE PLATELET AGGREGATION INDUCED BY TMV

兔血以EDTA、草酸钠、肝素或枸橼酸钠抗凝（图示抗凝剂的最终浓度）分离PRP后，加入TMV（10、40μg/ml）测定血小板聚集反应。

二、TMV引起的血小板5—羟色胺的释放反应

TMV引起血小板聚集时伴有5—HT的释放，由血小板中释放5—HT的量与反应体系中TMV的最终浓度相关。按荧光光度法测定结果，家兔血小板5—HT的含量为1.60±0.418ng/10⁵血小板。12.5μg/ml的TMV可引起13.6%的血小板5—HT释放。引起血小板5—HT最大释放的TMV浓度为100μg/ml（表2）。

表2　不同浓度TMV引起的家兔血小板5—HT的释放反应（%）*

DOSE-RELATED RELEASE OF SEROTONIN(%) FROM RABBIT PLATELETS CHALLENGED WITH TMV

家兔 Rabbit	5—HT含量 Content of 5-HT ng/10^5	血小板 Plts 200μg/ml	TMV的最终浓度 Final Concentration of TMV 100μg/ml	50μg/ml	25μg/ml	12.5μg/ml	6.25μg/ml
1	1.72	63	63	58	49	44	20
2	1.85	81	89	87	48	23	0
3	0.97	84	83	88	38	2.9	0
4	1.19	74	70	40	0	0	0
5	1.87	58	46	31	20	5.0	0
6	2.00	65	80	59	25	6.5	0
$\bar{X}$	1.60	71	72	60.5	30	13.6	3.3
SD	0.418	10.46	15.70	23.48	18.80	16.90	8.16

* 5-HT与邻苯二甲醛缩合后，用荧光光度法测定

Serotonin measured fluometrically after condensation with O-phthaldialdehyde.

三、TMV诱导家兔血小板形成和释放TXA_2样物质

TMV与家兔PRP孵育后的混合物，倾入动脉条浴槽，即可见动脉条收缩。动脉条收缩的百分率与TMV在混合物中的最终浓度相关，并与血小板聚集相平行（图3）。诱导动脉条最大收缩(55.63±22.21%)的TMV浓度为100μg/ml。而花生四烯酸(500μg/ml）引起动脉条最大收缩为41.26±5.22%。血小板聚集采用比浊法测定，TXA_2样物质用兔动脉条收缩的生物测定法，6只家兔试验，图示其中典型测定结果。

四、阿斯匹林对TMV诱导血小板聚集和TXA_2样物质形成的抑制作用

家兔PRP与低浓度阿斯匹林（1.04m*M*、4.15m*M*）孵育2分钟后，再加入TMV测定

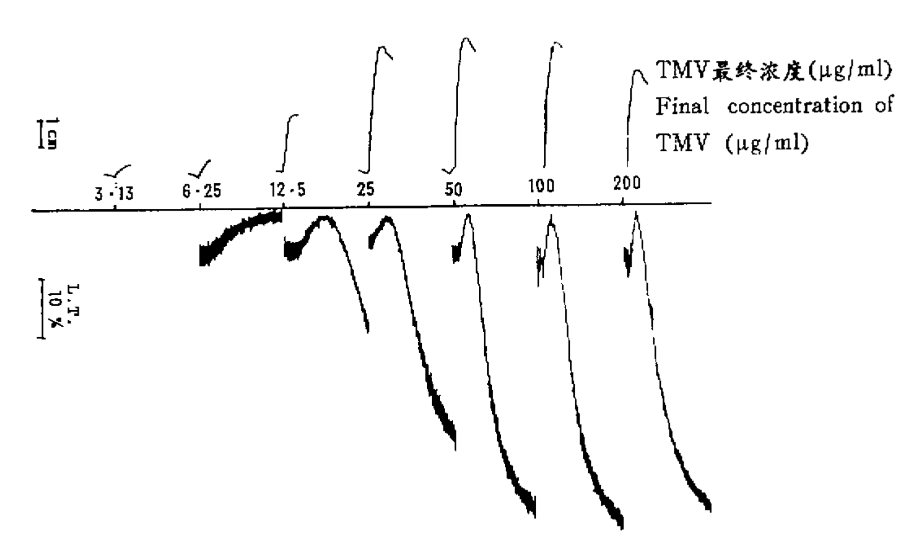


图 3 TMV诱导家兔血小板聚集及TXA_2样物质的形成。血小板聚集用比浊法测定（聚集仪BS631）TXA_2样物质用兔动脉条收缩的生物测定法

Fig 3 RABBIT PRP WAS CHALLENGED WITH THE INDICATED CONCENTRATION OF TMV (Horizontal Scale μg/ml). THE PLATELET AGGREGATION AND THE PRODUCTION OF THROMBOXANE A2 WERE DETERMINED RESPECTIVELY BY THE TURBIDIMETRIC METHOD (Aggregometer BS631) AND THE BIOASSAY ON A RABBIT AORTA STRIP

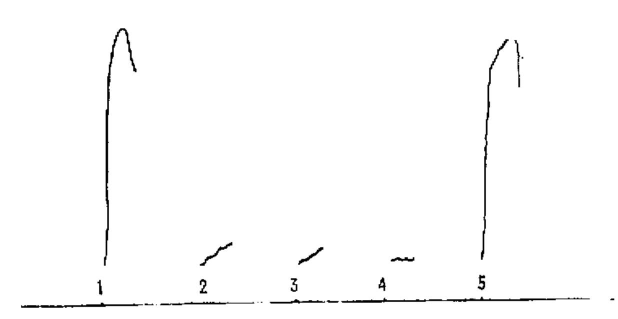


图 4 在阿斯匹林作用下TMV(50μg/ml)造成兔动脉条收缩的不同结果。阿斯匹林最终浓度：1)0；2)1.04*mM*；3)4.15*mM*；4)16.6*mM*；5)0。

Fig 4 THE FORMATION OF TXA_2 INDUCED BY TMV IN PRESENCE OF DIFFERENT CONCENTRATION OF ASPIRIN 1)0; 2) 1.04m*M*; 3) 4.15m*M*; 4) 16.6m*M*; 5) 0.

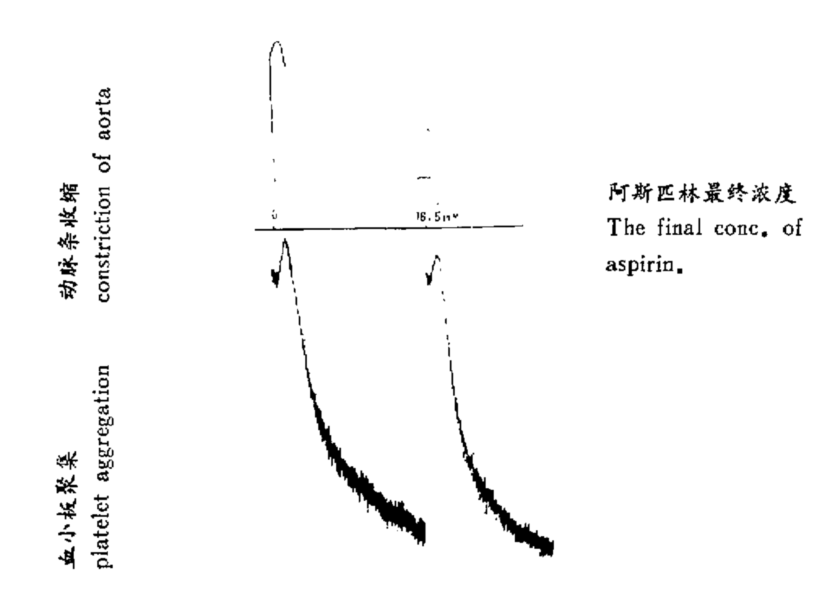


图 5　阿斯匹林（横座标示其浓度）对TMV(50μg/ml)所致兔动脉条收缩及兔血小板聚集的影响。

Fig 5　EFFECT OF ASPIRIN ON THE FORMATION OF TXA_2 AND THE PLATELET AGGREGATION INDUCED BY TMV(50ul/ml)

TXA_2样物质的形成与释放，结果动脉条收缩反应显著减弱。家兔PRP与高浓度阿斯匹林(16.6mM)孵育可完全抑制动脉条的收缩，但对TMV诱导的聚集反应没有影响（图4、5、）。结果表明，阿斯匹林可阻断TMV诱导的TXA_2形成，而不影响 TMV 的血小板聚集作用。

讨　　论

血小板在血栓形成与止血过程中起着重要作用，研究血小板活化的生理机制具有较大的理论和实用价值。促进血小板活化的因素有多种。ADP可直接诱导血小板发生聚集，并引起血小板的释放反应。胶原则通过血小板内源性 ADP 的释放而引起血小板聚集，大量胶原可以通过花生四烯酸—前列腺素代谢途径引起TXA_2的形成。TXA_2是迄今发现的最强力的血小板聚集剂，因此TXA_2与ADP一样亦被认为是诱导血小板聚集的主要介质。

本文结果表明TMV可以诱导人与多种动物的血小板发生聚集，同时伴有血小板5—HT释放和TXA_2的形成。在不同浓度的TMV作用下家兔血小板 5—HT释放和TXA_2的形成和释放率与家兔血小板的聚集强度相平行（图6）。随着 TMV 的浓度增加，血小

板聚集强度、5—HT释放和TXA_2的形成释放率均增加。引起血小板最大聚集和释放的TMV浓度为100μg/ml，而TMV浓度超过100μg/ml时，血小板聚集和释放率有所降低。

TMV 引起的血小板聚集反应依赖于钙离子的存在，EDTA 能抑制TMV 的血小板聚集作用，表明 TMV 的作用机制不同于美洲矛头蝮蛇毒的“瑞斯托霉素样”作用。后者凝聚血小板的作用不依赖于钙离子，而取决于血浆中von Willebrand 因子的浓度。肝素不影响 TMV 的血小板聚集作用，表明 TMV 对血小板的作用不通过凝血酶，即不同于矛头蝮蛇毒和响尾蛇蛇毒对血小板的作用。

本文结果证明 TMV 可以引起血小板致密体内容物（5—HT）的释放。Ouyang 和 Teng（1978）研究台湾产的 TMV 亦可以引起血小板致密体的核苷酸（ADP、ATP）等释放，但他们进一步研究表明TMV的血小板聚集作用不依赖于血小板内源性ADP的释放，不受ADP清除系统的影响，而可能与血小板的前列腺素合成途径有关（Ouyang and Teng 1979）。

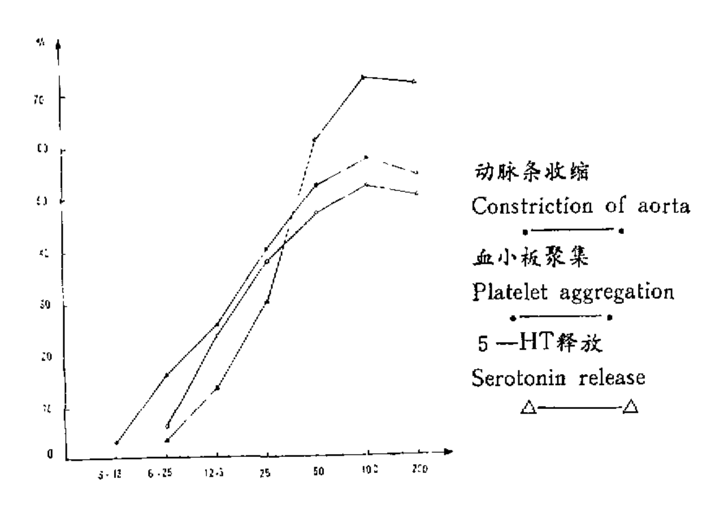


图6 TMV 引起的兔血小板聚集，5—HT释放和TXA_2释放（兔动脉条收缩）的剂量关系曲线。

Fig 6 TMV DOSE-RELATED CURVES OF RABBIT PLATETET AGGREGATION, SEROTONIN RELEASE AND RABBIT AORTA STRIP CONSTRICTION DUE TO THROMBOXANE A2

血小板的前列腺素合成途径是由花生四烯酸经环氧化酶的作用形成前列腺素的环内过氧化物（PGG_2、PGH_2），后者又可以通过TXA_2合成酶作用转变为TXA_2。阿斯匹林通过对环氧化酶的乙酰化作用而抑制血小板的前列腺素合成。本文研究证明阿斯匹林可以阻断 TMV 诱导的家兔血小板的 TXA_2 形成，但并不影响 TMV 的血小板聚集作用（图5），提示TMV可能通过不依赖TXA_2，即不通过前列腺素合成的途径引起血小螆

的活化和聚集反应。

最近Vargaftig等(1980)报告南美响尾蛇卡氏亚种毒蛇（*Crotalus durissus cascavella*）的蛇毒对血小板的活化作用亦不依赖于ADP和TXA_2，本文研究的TMV有类似之处。因此对TMV促使血小板活化的聚集素的生化、结构和作用机理的深入研究，可能有助于阐明血小板活化的生理机制。

参 考 文 献

阮长耿 1979 蛇毒与血液凝固．江苏医药，5：17。

Caen, J. et al. 1975 L'hémostase, 2ème édition, Expansion scientifique, Paris. P. 71.

Carzon, G. & Green, A. R. 1970 Rapid method for the determination of 5—hydroxytryptamine and 5—hydroxyindoleacetic acid in small regions of rat brain. *Brit. J. Pharmacol*. 39：653.

Davey, M. G. & Lüscher, E. F. 1965 Actions of some coagulant snake venoms on platelets. *Nature* (Lond.). 207：1037.

Needleman, P. et al. 1976 Thromboxanes：selective biosynthesis and distinct biological properties. *Science*. 193：163.

Niewiarowski, S. et al. 1979 Thrombocytin, a serine protease from Bothrops atrox venom. I. Interaction with platelets and Plasma-clotting factors. *Biochemistry*. 18：3570.

Ouyang, C, & Teng, C—M. 1978 The effect of Trimeresurus mucro squamatus snake venom on platelet aggregation. *Toxicon*. 16：575.

Ouyang, C. & Teng, C—M. 1979 The action mechanism of the purified platelet aggregation principle of Trimeresurus mucrosquamatus venom. *Thrombos. Haemostas*. (Stuttg.) 41：475.

Read, M. S. et al. 1978 Venom coaglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA. 75：4514.

Schmaier, A. H. & Colman, R. W. 1980 Crotalocytin: characterization of the Timber rattlesnake Platelet activating protein. *Blood*. 56：1020.

Vargaftig, B. B. et al. 1980 Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of Crotalus durissus caseavella. *Eur. J. Pharmacol*. 68：451.

THE ACTIVATION OF PLATELET INDUCED BY THE VENOM OF TRIMERESURUS MUCROSQUAMATUS (FROM HUNAN PROVINCE)

Ruan Changgeng Xi Xiaodong Wan Haiying Li Peixia
(Thrombosis and Haemostasis Research Laboratory, Suzhou Medical College)

Gu Zhenlun Pan Jianxin Zhu Lujia
(Department of Pharmacology, Suzhou Medical College)

Wang Wanyu Xiong Yulianq Yang Changjiu Chen Xilan
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Trimeresurus Mucrosquamatus venom (TMV) induced the concentration-dependent aggregation of platelets of different species. The threshold concentrations of TMV inducing the platelet aggregation of human, rabbit, dog and Guinea pig were 2.0, 12.5, 2.0 and 0.6ug/ml respectively. EDTA interfered with the platelet aggregation by TMV, but heparin did not prevent the action of TMV. The platelet aggregation induced by TMV was accompanied by the release of serotonin (5—HT) from the challenged platelets. The concentration of TMV which induced the maxium release of 5—HT (72%) from rabbit platelets was 100μg/ml. The TMV also induced the formation of Thromboxane A2 (TXA2) of platelets. The inhibition of cyclo-oxygenase with aspirin, which reduced and abolished the formation of TXA2, but didnot suppress platelet aggregation induced by TMV. Thus, thromboxane-independent mechanisms should account for platelet activation with TMV. Our preliminary results showed that TMV is a good tool for studying the activation of platelets.